

疾患バイオマーカーの橋渡し研究

小海 康夫

札幌医科大学医学部フロンティア医学研究所病態情報学部門

Developing translational research of blood biomarkers: fundamental aspects of biomarker exploration thorough our experiments

Yasuo KOKAI

Department of Biomedical Engineering, Research institute of frontier medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

ABSTRACT

The prospect of employing blood proteins as potential disease biomarkers has been received with reasonable anticipation. Recent advances in mass spectrometric analysis in combination with informational science of human biology have significantly accelerated research in biomarkers development. It is, however, plausible that complexity of blood proteins, including a broad range of protein concentration in the presence of other components such as lipids and sugars, has hampered attempts to dissect plasma proteome in depth. Exploration for blood biomarkers requires to simultaneous manipulation of these conflicting factors. To overcome these obstacles, we propose the establishment of a simple target disease model that reduces complexity of blood proteome. The model can then be employed toward proteomic analysis focusing on plasma proteoms. In this review, we introduce two examples of such modeling and biomarker candidates. We also examine briefly a novel view of pathology with these novel biomarkers.

(Accepted November 18, 2019)

Key words: blood biomarker, proteomics, model, pathology, protein chemistry

1. はじめに

血液は身体の諸臓器をくまなく還流することから、血液に含まれる物質の分析は各臓器の生理や病理を反映する目安＝バイオマーカーの可能性があり、広く血液生化学検査やウイルス診断に応用されている。この背景を受けて種々の疾患の早期客観診断や治療効果の判定を目指した新規バイオマーカーの単離同定が盛んに試みられている。しかし、多彩なタンパク質群が広い濃度範囲で動的に変動する血清や血漿のプロテオミクス解析は極めて困難な作業と言わざるを得ない。低濃度のタンパク質を高濃度の共存タンパク質や脂質などの夾雑分子群の存在のもとに同定分析することは現在でも極めて困難である¹⁾。これらの現状を改善する試みのひとつとして、情報科学、タンパク質化学、質量分析などの方法を適切に組み合わせて対象のプロテオームをより単純にモデル化することが検討されている。本稿では、われわれが検討した2つの疾患における実験動物やタンパク質化学を活用し複雑な血漿プロテ

オームをダウンサイジングする試みについて紹介する。疾患の選択とモデル化の基本的な考え方を説明し、成果と課題について考察したい。

2. バイオマーカー探索のための疾患動態の考察

図1は、疾患の病態を単純化したモデル図である。病態は疾患の開始前には存在しない。臨床的に発症とされる疾患の検出可能な段階、いわゆる overt なステージ

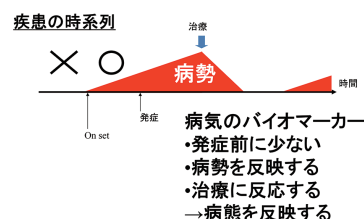


図1. 病態のモデル化による「バイオマーカー」の探索

バイオマーカーが病気の勢い、すなわち病勢を反映するものであると仮定したときの、バイオマーカーの量的変動の特徴を示す。バイオマーカーは病勢と相関して変動する。

によって臨床的な発症が検出され、有効な治療が施されないかぎり病勢は進行していく。治療が奏功すると病勢は減少し、治癒した場合は病勢は発症前の無病のレベルに戻る。再発ではこの変化が繰り返される。バイオマーカーが病勢を反映するものであると仮定すれば、バイオマーカー候補は病勢と平行して増減する物質である可能性が高い。ここで実疾患に目を向けると、発症前の段階では病気の状態は臨床的に検出されていないことから、この時点ではあるレベルの病勢にすでに到達しているにも関わらず、臨床的病勢はゼロと認識される。そのため onset のタイミングでのバイオマーカーは発症時点では臨床的にゼロと扱われる。しかし疾患が overt な状態になる前から早期の疾患は存在していることが多くの疾患で自明と理解されている。

新たに開発するバイオマーカーの量的変動のモデルを「発症時にゼロ」と定義すると図1が示すように発症時ですでに一定の病勢が存在していることになり、定義そのものが間違っていることになる。疾患の早期が病勢の開始に相当しない事実が示されている。腫瘍などの進行性病変の臨床的な初期状態と病気の開始時点が明らかに異なることになり、量を目安にしたバイオマーカー開発に重大な問題を提示している。臨床的にいかなる早期の状態でも疾患のゼロ点に相当しない。病勢を反映する物質を量の変化で定義しようとすると、図1のごとく病気の無いときには存在せず、病勢が増悪すると増え、治療が奏功すると減少する物質ととらえることができる。病気を無い状態から病気を導入することは、人疾患では不可能なことから病態モデルとして動物モデルを用いることが必要となる。様々な予備的検討の後、マウスアロ骨髄移植における移植片対宿主病 (Graft versus Host disease, GVHD) を病態モデルとした GVHD の血漿バイオマーカー単離に着手した。

3. バイオマーカー探索の実際

3.1 移植片対宿主病のバイオマーカー研究

造血幹細胞移植 (Haematopoietic Stem Cell Transplantation; HSCT) は白血病などの重篤な悪性腫瘍、先天性代謝異常、難治性貧血症などを根本的に治癒できる治療法である。特に悪性腫瘍の治療では、移植片に含まれるドナー T 細胞が宿主の悪性腫瘍細胞のアロ抗原を認識して攻撃する GVT (Graft versus Tumor) 効果が期待され、悪性疾患の根治を可能とする強力な免疫療法の側面を併せ持つ。しかしながら、ドナー T 細胞が引き起こす GVHD と GVL はドナー T 細胞のアロ抗原認識という視点からは同値の生理的な免疫認識であり、GVL が起こる状態はすなわち GVHD も発症する背景を与え、両者を分離することは現状では困難である。加えて HSCT 早期には、移植

のための前処置や GVHD 予防のための治療により患者は高度かつ多様な組織障害を背景とした重度の免疫抑制状態にある。そのため深刻な易感染状態にあり、日和見感染が懸念される。特にウイルス感染が頻発し、GVHD に類似した皮膚症状を呈することがあり、しばしば鑑別診断に難渋する²⁾。

GVHD の早期客観診断は、強力な造血幹細胞移植治療を安全に実施することを推進する可能性があり臨床的に極めて重要な取り組みと言える。我々はマウスモデルを用いて、実験動物の特徴を生かして GVHD のバイオマーカーを以下の如くモデル化した。

条件1: 感度・特異度ともに 100%を示す。

条件2: 病気の発症と進行に相関する。

条件3: 治療に反応する。

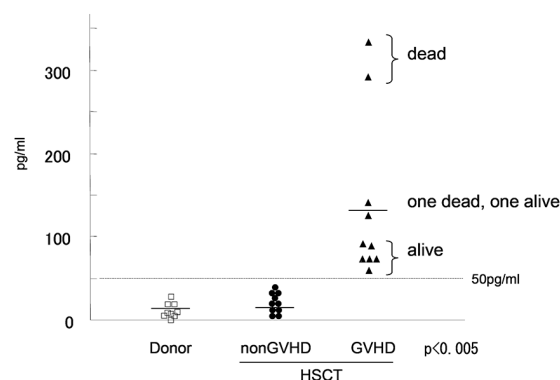
条件4: 重篤度と相関する。

血漿のプロテオミクス解析において、このモデルを完全に満たす分子を探索したところ 1 種類の分子が得られ、精製後タンパク質を同定した。得られた分子ケモカイン CCL8 は GVHD を含む免疫炎症に深くかわる分子であり、患者血漿の解析でも GVHD と強い相関を示すことが確認された (図2)。実験の詳細は文献³⁾を参照いただきたい。

3.1.1 本研究に関する知的財産

発明の名称「移植片対宿主疾患の検査および治療方法」として出願し、現在までに日本・ドイツ・イギリス・フランス・中国・韓国・ロシア・オーストラリア・カナダ 9 か国で特許権を取得済みである。また、治療に関して米国・カナダ・ロシアで分割出願係属中である。

3.1.2 移植片対宿主病のバイオマーカーの考察



ELISAによる定量: 50pg/mL以上はGVHDのみ

図2. 免疫定量による血液 CCL8 濃度と GVHD

移植片対宿主病 (GVHD) バイオマーカー候補として単離されたケモカイン CCL8 の血漿濃度は GVHD とよく相関して変動することが示された。

CCL8 と GVHD の関連をさらに検討すべくマウスモデル^{4,5)}や臨床サンプル⁶⁾で検討を継続している。これらの研究から CCL8 は造血幹細胞移植早期にアロ T 細胞が宿主抗原提示細胞から抗原提示される過程で発現誘導されることが分かって来た。患者サンプルを用いた初期的検討では、早期の発現は移植片の生着前から認められる。同時期に頻発するウイルス感染症 (HHV6) では発現増加は認められず、移植早期の GVHD とウイルス感染症の鑑別に有効である可能性が示唆された。さらに移植早期での CCL8 の発現増加はアロ抗原認識に引き続くものであるため、移植早期での患者体内で起こっている複雑な免疫現象を客観的にモニターできる可能性が示唆され、ほとんど解明されていない造血幹細胞移植早期のイベントを分子レベルで解明していく探索針としての活用も期待される。

3.2 アルツハイマー病のバイオマーカー研究

アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease; AD) は特定の脳神経細胞にアミロイド前駆体タンパク質由来の特有なペプチド (Amyloid β ; $A\beta$) が沈着することがきっかけとなり神経細胞が変性壊死する難病である。加齢が最大の危険因子であることから世界的に進む高齢社会での重大な社会問題とされている。 $A\beta$ ペプチドの凝集体が AD 脳の老人斑と呼ばれる変性神経細胞の集積に検出されることから AD の発症に $A\beta$ ペプチドが重要な役割を果たしていることが認識されているが、分子レベルでの詳細な発症のメカニズムは不明な点が多い。AD 脳には同時にリン酸化タウタンパク質と呼ばれる別の凝集体が神経原線維変化を起こし神経細胞の変性壊死をもたらすことも知られている。これらのタンパク質異常がどのように AD を発症させ病態の進行をもたらしているのかは多くの謎が残っている。一方 $A\beta$ ペプチドの脳における沈着は認知機能が正常な健常者にも中年以降広く認められ、 $A\beta$ ペプチドの病因としての位置づけにも不明な点が多い⁷⁾。

$A\beta$ ペプチドの神経細胞毒性は、ペプチドを一定条件下に孵置することによって分子内包的に凝集体が形成された結果として発現される。凝集した $A\beta$ ペプチドはアミロイドと呼ばれる状態に安定し、凝集していないモノマーには認められない神経細胞毒性を示す。マウス AD モデルに $A\beta$ ペプチド中和抗体を投与することにより一定の認知機能が改善すること、早期認知機能低下者の一部に $A\beta$ ペプチド中和抗体を投与した臨床試験でも一定の機能改善を示唆する結果が出ていることから、 $A\beta$ ペプチドの凝集体は神経細胞の変性を生体内で惹起する作用を有していることが示されている⁸⁾。

脳は脳血液関門によって抹消血液循環からは隔離された臓器である。脳で生じたタンパク質などの分子の発現変化を末梢血で検出するためには、脳血液関門を通過しうる分子群が候補分子群となることが示唆される。先行研究で山口らはフォスファチジルセリンに結合するアネキシン A5 が AD 患者血漿で増加していることを示した⁹⁾。同時にアネキシン A5 を放射性ラベルして抹消から静脈投与すると AD 患者脳に特徴的に集積することが報告されている¹⁰⁾。これらの事実を受けて初代培養神経細胞を用いて AD バイオマーカー候補を探索するために候補分子が満たすべき条件を以下の如くモデル化した。

条件 1: $A\beta$ ペプチド凝集体添加により培養上清中に増加する。

条件 2: AD モデルマウス老人斑に分布する。

条件 3: 正常コントロールマウス脳には発現しない。

条件 4: 健常高齢者血漿では低値であり、AD 患者血漿では増加する。

培養神経細胞の培養上清中に含まれるフォスファチジルセリンに結合するタンパク質を独自に開発したナノリポソーム (図 3) を用いて回収し、得られたタンパク質の質量分析による網羅的解析を行った。上記条件を

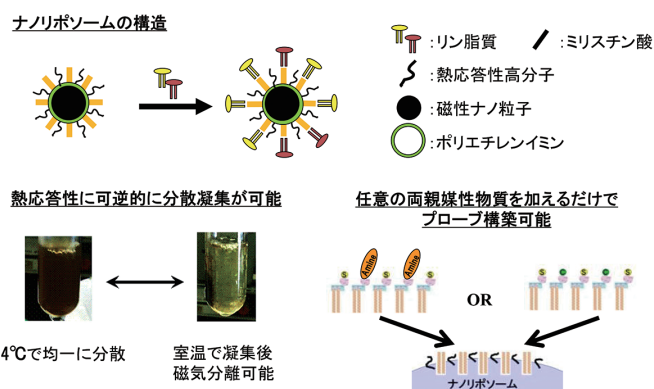


図 3. リン脂質結合プローブナノリポソームの開発

リポソーム外葉をフォスファチジルセリンという単一リン脂質 100% で構成することを可能にし、表面積の最大化するための磁性ナノ粒子の開発原理を示す。

満たすタンパク質として MFG-E8 というアポトーシス制御に重要な役割をするリン脂質結合タンパク質が単離同定された。実験の詳細は木村らの文献を参照いただきたい¹¹⁾。

3.2.1 本研究に関する知的財産

発明の名称「親油性分子で表面修飾された温度感受性磁性微粒子および該微粒子と両親媒性分子を含むリポソーム用構造体を形成する組成物」
として本邦で特許権を取得済み、

発明の名称「アミロイドβ神経障害バイオマーカー」
として日本・ベルギー・スイス・ドイツ・フランス・イギリス・イタリア・オランダ 8 か国で特許権を取得済みである。

3.2.2 アルツハイマー病のバイオマーカー研究の考察

AD は、高齢社会に立ちはだかる大きな課題であるにもかかわらず、病態に関しては不明な点が多く、早期診断早期治療に重大な問題を投げかけている。我々は、長期にわたり健常高齢者と臨床的に確定診断が得られている AD 患者を含む血漿コホートを構築している。このサンプルを用いて MFG-E8 を定量すべく免疫定量法 (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay; ELISA) を開発している。開発初期の ELISA を用いた解析で MFG-E8 が AD 患者で統計学的に有意に増加していることを独立した 3 回の後ろ向き臨床研究で

確認した¹²⁾。

MFG-E8 は、リンパ球分子上のインテグリンに結合するドメインとアポトーシスに陥った細胞の膜上に出現するフォスファチジルセリンに結合する Discoidin ドメインと呼ばれる 2 種類の機能ドメインを有する¹³⁾。Discoidin ドメイン由来のペプチドは *in vitro*, *in vivo* とともに凝集体を形成しアミロイド構造を示すように変化する。そこで AD モデルマウスの脳での MFG-E8 発現を免疫染色で検討すると、検出されたすべての老人斑に Aβ ペプチドと共存して MFG-E8 が凝集して発現していることが判明した (図 4, 文献 11 より引用)。これらの結果は、MFG-E8 は AD バイオマーカーを検出するために設定したモデルの 4 条件をすべて満たす分子であることを示している。

MFG-E8 の Discoidin ドメイン由来のペプチドが凝集して形成するアミロイドは、Medin と呼ばれ動脈硬化動脈の中膜に特異的に分布することが報告されている¹⁴⁾。すなわち MFG-E8 そのものもアミロイド形成タンパク質であると言える。AD 脳にはアミロイド前駆体タンパク質、タウの 2 種類のタンパク質由来のアミロイドが存在することが以前から報告されている。MFG-E8 は本研究で同定された AD における第 3 のアミロイド形成性のタンパク質である。

MFG-E8 の AD モデルマウス (Tg2576) 老人斑への特異的な集積は、異なる遺伝子系を用いた他の AD モデルマウス (APP^{Swe}, PSEN1dE9) でも形成され、

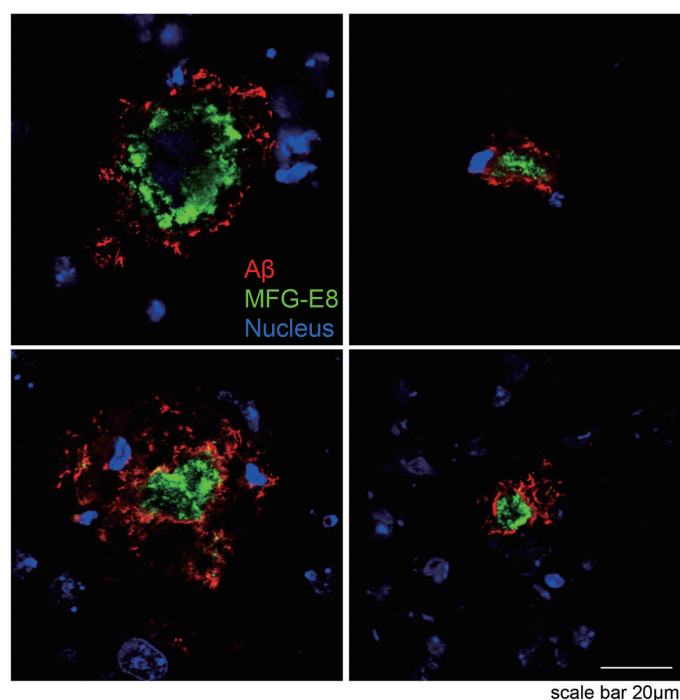


図 4. AD モデルマウス老人斑での MFG-E8 発現

培養細胞 AD モデルとしての神経細胞培養上清からプロテオミクス解析で同定された MFG-E8 の AD マウスモデル老人斑に一致する分布を示す。

少なくともマウス AD モデルでは A β ペプチドと同様に老人斑形成に関わっていることが示唆される。タウ、アミロイド前駆体に加え MFG-E8 もアミロイド形成能を有している。これらの分子が個別に神経細胞変性に関わっているという分子機構を想定する考え方に加え、AD 脳では一定のタンパク質群がアミロイド形成をする環境を有している可能性も示唆される。今後は、より特異性の高い ELISA を開発構築し、AD 患者サンプルにおける MFG-E8 の高次構造に関する知見を探索することを目指す。

4. 橋渡し研究の視点からの考察

4.1 疾患バイオマーカーの橋渡し研究

ここまで疾患のモデル化という視点によって血漿プロテオームの高度な複雑性をダウンサイジングする試みを我々の実験を例に紹介した。一定のレベルでの成果は認められるものの、臨床応用への道はまだ先であることは論を待たない。基礎研究と臨床研究の推進によるバイオマーカーの真正性の検証と、新たに得られたバイオマーカー候補から見た疾患の病理について検証を続ける必要がある。

以上述べてきた疾患バイオマーカーの探索は、いわゆる橋渡し研究に他ならない。大学発の基礎研究で得られた知見を社会実装するという観点から橋渡し研究は、医学研究の明らかな方向性の一つである。本稿で取り上げた疾患バイオマーカーの研究は、当初から橋渡し研究として設計されたユニークな取り組みである。最終項として、当事者として橋渡し研究を実施してきた観点からその意義と将来性について考察を加える。

橋渡し研究という言葉が人口に膾炙するまでは、基礎医学者の成果は学会や論文に発表されることが主なものであった。学会や論文は、当該領域の専門家に評価を得ることを主たる目的とする閉じた領域であるため、ごく一部の実用研究を除いて基礎医学研究の成果が社会に広がることは稀であった。当該領域の専門家どうしの peer to peer な情報交換はその領域の先端的な討論を喚起するという点では極めて貴重なものであるが、社会への実装という点では距離感を否めない。米国 NIH などが主導となり、世界的に橋渡し研究の推進の機運が高まり、われわれの日常研究にも新たな観点が導入された。北海道臨床開発機構（北海道大学、札幌医科大学、旭川医科大学）の設立は、本稿で紹介した研究と時を同じくして開始され、北海道臨床開発機構の支援のもと紹介した研究は推進されていった。

基礎研究の社会実装、すなわち Bench to Bed は第一層橋渡し研究（Translational Research 1; T1）と呼ばれる。臨床という複雑系への進展は、基礎研究の視点だけでは到底網羅できないのは当然であり、臨床応用は基礎研究からの演繹的な視点だけでは橋渡し

の達成はおぼつかない。言葉を換えれば、基礎医学者だけで考えた一方通行の橋渡し研究では橋は渡れない。臨床家との共同した臨床研究計画の設計と実施、中立的な統計学者とのデータ解析、そしてさらに臨床的価値を高めるべく積み上げる研究の継続が T1 成功の必須の要因であろう。

4.1.1 T1 から T2 への橋渡し研究の展開

T2 と呼ばれる橋渡し研究は、T1 の検討から新たに生じた基礎研究と解釈されることが多い。ここで臨床観察から基礎研究へ問題提起のみを投げかける形に陥ると、臨床疑問の深い理解を臨床家と基礎医学者が共有できなくなる。密接な討論により T2 研究を深めていく必要がある。幸運なことに今回紹介した 2 つの研究は双方ともに T2 に入りつつある。基礎研究者としてうれしい限りである。研究課題を基礎から臨床、臨床から基礎と継続して検討しつつける基礎臨床が一体になった研究体制が実り豊かな橋渡し研究に重要であるということができよう。

4.1.2 橋渡し研究のツールとしての知的財産戦略

橋渡し研究の担当者は、アカデミーの研究者と企業の研究者からなり、お互いの得意な分野を持ち寄って進行していく。共同研究を円滑に進めるために知的財産は必須の要素である。幸い本学は知的財産の支援体制が整備され、熱心な担当者の皆さんが力強く基礎研究者を支える体制が確立している。一方で、本来は知財担当の専門家であり学術研究者である教員が企業連携における研究費配分などにも関わらざるを得ない現状は改善すべき課題であろう。限られた人員だからこそ、オーバーラップした領域を合理的に再配分して、より質の高い研究実施体制を関係者が一丸となって確立することを期待する。

5. まとめ

橋渡し研究としての血液疾患バイオマーカーの開発を著者らの研究を通して考察した。バイオマーカー探索の戦略構築、情報科学と物理的分析の連結、疾患概念をタンパク質化学に投射するプローブの設計など、血液疾患バイオマーカーの開発は総合格闘技の様を呈する。同時に、橋渡し研究の外溝である企業との共同研究に向けた知財戦略をタイミングよく推進する必要性を理解した研究支援体制など、橋渡し研究の奥行を堪能した。本学における橋渡し研究の発展に向けた基礎研究者と臨床家の一層の真摯で密なかかわりを期待する。

6. 謝辞

稿を終えるにあたり、本総説で紹介した研究は、文部科学省、厚生労働省、科学技術振興機構、北海道臨床開発機構をはじめとする多くの助成の元に推進されました。また多岐にわたる専門領域での学際的研究であるため、広く多数の共同研究者との共同作業でもあります。ここにすべての皆さまへ深甚なる感謝の意を表します。

文献

1. Pernemalm M, Lehtio J. Mass spectrometry-based plasma proteomics: state of the art and future outlook. *Expert Rev Proteomics*. 2014; 11: 431-448.
2. Ferrara JM, Levine JE, Reddy Py, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373: 1550-1561.
3. Hori T, Naishiro Y, Sohma H, Suzuki N, Hatakeyama N, Yamamoto M, Sonoda T, Mizue Y, Imai K, Tsutsumi H, Kokai Y. CCL8 is a potential molecular candidate for the diagnosis of graft versus host disease. *Blood*. 2008; 111: 4403-4412.
4. Ota A, Yamamoto M, Hori T, Miyai S, Naishiro Y, Sohma H, Maeda M, Kokai Y. Up-regulation of plasam CCL8 in mouse model of graft-versus-host disease *Exp Hematol*. 2009; 37: 523-531.
5. Yamamoto M, Ota A, Hori T, Imai S, Sohma H, Suzuki N, Hatakeyama N, Inazawab N, Ito M-Y, Kimura H, Tsutsumi H, Kokai Y. Early expression of plasma CCL8 closely correlates with survival rate of acute graft-versus-host disease in mice. *Exp Hematol*. 2011; 39: 1101-1112.
6. Yamamoto M, Hori T, Hatakeyama N, Igarashi K, Inazawa N, Suzuki N, Takei N, Ito Y-M, Matsumoto K, Kato K, Tsutsumi H, Kokai Y. Early expression of serum CCL8 closely correlates to non-relapse mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Sapporo Med J*. 2018; 86: 45-51.
7. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018; 25: 59-70.
8. Sakono M1, Zako T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J*. 2010; 277: 348-358.
9. Yamaguchi M, Kokai Y, Imai S-I, Utusmi K, Matsumoto K, Honda H, Mizue Y, Momma M, Maeda T, Toyomasu S, Ito MI, Kobayashi S, Hashimoto E, Saito T, Sohma H. Investigation of Annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease using neuronal cell culture and mouse model. *J Neurosci Res* 2010; 88: 2682-2692.
10. Lampl Y, Lorberboym M, Blankenberg F-G, Sadeh M, Gilad R. Annexin V SPECT imaging of phosphatidylserine expression in patients with dementia. *Neurology*. 2006; 66: 1253-1254.
11. Kimura M, Sohma H, Matsuki K, Yamaguchi M, Imai S, Kokai Y. Milk fat globule-EGF-factor 8 is induced from neuronal cells upon stimulation of A β oligomer and specifically localizes in amyloid plaques in the brain of mouse model for Alzheimer's disease. *Sapporo Med J*. 2017; 85(Suppl); 23-34.
12. Sohma H, Kokai Y. Plasma Biomarkers in Alzheimer's Disease. In: Moretti D. ed. *Update on Dementia*. [Internet]. London: IntechOpen, 2016.9, [cited 2019 Nov.18] chapter 4. Available from <https://www.intechopen.com/books/update-on-dementia/plasma-biomarkers-in-alzheimer-s-disease>. doi: 10.5772/64512
13. Raymond AI, Ensslin MA, Shur BD. SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions. *J Cell Biochem*. 2009.15; 106: 957-966.
14. Häggqvist B, Näslund J, Sletten K, Westermark GT, Mucchiano G, Tjernberg LO, Nordstedt C, Engström U, Westermark P. Medin: an integral fragment of aortic smooth muscle cell-produced lactadherin forms the most common human amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 8669-8674.

別刷請求先：小海 康夫

〒060-8543 札幌市中央区南1条西17丁目
札幌医科大学医学部フロンティア医学研究所病態情報学部門
TEL: 011-611-2111 (内線 25200)
FAX: 011-615-2315